

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-342255

(43)Date of publication of application : 12.12.2000

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

A01H 1/00

(21)Application number : 11-158024

(71)Applicant : JAPAN TOBACCO INC

(22)Date of filing : 04.06.1999

(72)Inventor : HIEI YOSHIHIRO  
KASAOKE KEISUKE  
ISHIDA YUJI

## (54) IMPROVEMENT IN EFFICIENCY OF GENE TRANSFER TO PLANT CELL

### (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To improve the efficiency of gene transfer to a plant cell simply carried out through a bacterium of the genus *Agrobacterium* without damaging a tissue, to perform transformation and to better a breed by heat-treating a plant cell or a plant tissue.

SOLUTION: A plant cell or a plant tissue derived from a plant selected from the group consisting of rice plant, maize, lawn grass and tobacco is heat-treated at 33-60° C, preferably 35-55° C, more preferably 37-52° C for 5 seconds to 24 hours, especially preferably at 37-52° C for 5 minutes to 24 hours to improve the efficiency of gene transfer to a plant cell carried out through a bacterium of the genus *Agrobacterium*. Preferably the plant cell or plant tissue is derived from an angiosperm, a monocotyledon or a gramineous plant. Preferably after the plant cell or plant tissue is heat-treated or centrifuged, a gene transfer treatment is performed.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-342255

(P2000-342255A)

(43) 公開日 平成12年12月12日 (2000.12.12)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームコード (参考)
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A 2 B 0 3 0
A 0 1 H 1/00		A 0 1 H 1/00	A 4 B 0 2 4

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願平11-158024

(22) 出願日 平成11年6月4日 (1999.6.4)

(71) 出願人 000004569

日本たばこ産業株式会社

東京都港区虎ノ門二丁目2番1号

(72) 発明者 樋江井 祐弘

静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本た

ばこ産業株式会社遺伝育種研究所内

(72) 発明者 笠岡 啓介

静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本た

ばこ産業株式会社遺伝育種研究所内

(74) 代理人 100088546

弁理士 谷川 英次郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法

(57) 【要約】

【課題】 従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法よりも高い効率で組織を付傷することなく簡便に遺伝子導入を行うことができる、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供すること。

【解決手段】 植物細胞又は植物組織を熱処理することを伴う、アグロバクテリウム属細菌を介して行われる植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供した。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 植物細胞又は植物組織を熱処理することを伴う、アグロバクテリウム属細菌を介して行われる植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法。

【請求項2】 植物細胞又は植物組織を熱処理した後、遺伝子導入処理を行う請求項1記載の方法。

【請求項3】 熱処理が33℃～60℃の温度範囲で行われる請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】 熱処理が35℃～55℃の温度範囲で行われる請求項3記載の方法。

【請求項5】 熱処理が37℃～52℃の温度範囲で行われる請求項4記載の方法。

【請求項6】 熱処理が5秒間～24時間の範囲で行われる請求項1ないし5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 37℃～52℃の温度下で1分間～24時間熱処理を行う請求項1又は2記載の方法。

【請求項8】 用いる植物細胞又は植物組織が被子植物由来である請求項1ないし7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】 用いる植物細胞又は植物組織が単子葉植物由来である請求項8記載の方法。

【請求項10】 用いる植物細胞又は植物組織がイネ科植物由来である請求項9記載の方法。

【請求項11】 用いる植物細胞又は植物組織がイネ、トウモロコシ、シバ及びタバコから成る群より選ばれる植物由来である請求項8記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法に関する。

**【0002】**

【従来の技術】アグロバクテリウムによる形質転換法は、一般的に、効率が高い、導入される遺伝子のコピー数が少ない、T-DNAという特定の領域を断片化させることなく導入できる、短期間の培養により形質転換体を得ることができるため培養変異が少ないなど、多くの優れた特徴を持っている。このため、さまざまな植物種で最も有用な形質転換の手段として広く用いられている。

【0003】このように、アグロバクテリウム法は非常に優れた植物の形質転換方法であるが、形質転換の成否ならびに効率、植物種、遺伝子型ならびに用いる植物組織に依存して大きく異なるのが実状である(Potrykus et al. 1998(参考文献(35)))。すなわち、形質転換に成功していない植物種があるほか、ごく一部の品種のみ形質転換が可能な植物種も多い。また、利用可能な組織が限定されており大量の材料を取り扱うことができない植物種もある。遺伝子組換えにより実用的な品種を作出するには、多数の形質転換植物を作出した上で、目的とする形質を持った系統を選抜する必要がある。しかしながら、この目的に即し多数の形質転換体を容易に得るこ

とができる作物の種類は、現状では一部に限定されている。したがって、このような問題点を解決することができる改良手法の開発が強く望まれている。

【0004】アグロバクテリウムを介する形質転換方法自体は、植物種により供試材料や培養に用いる培地の組成などを異にするものの、材料となる組織にアグロバクテリウムの懸濁液を接触させ、共存培養の後に形質転換細胞の選抜を行い、形質転換植物を作出するという操作ではほぼ共通している。材料となる植物組織に対しては、通常、必要に応じ滅菌処理を行うがそれ以外に特別な処理を施すことなくアグロバクテリウムの感染が行われる(Rogers et al. 1988(参考文献(36))), Visser 1991(参考文献(40)), McCormick 1991(参考文献(31)), Lindsey et al. 1991(参考文献(30)))。従って、形質転換系の改良は、アグロバクテリウムの菌系、ベクター構成、培地組成、選抜マーカー遺伝子やプロモーターの種類、供試組織の種類などを中心に研究が行われてきた。

【0005】これに対し、アグロバクテリウムを接種する前の植物組織を、遺伝子導入が生じやすい生理的状态に変換するという考えに基づく研究は、ほとんど行われていない。何らかの簡便な処理により、そのような生理的状态に変換することができればいへん利用価値が高く、遺伝子導入効率の向上に加え、従来困難であった植物種や遺伝子型の形質転換を可能にする顕著な効果も期待される。これまでの植物組織への前処理に関する研究例としては、パーティクルガン(Bidney et al., 1992(参考文献(6)))および超音波(Trick et al., 1997(参考文献(39)))処理が上げられる。どちらも物理的に組織を付傷することでバクテリアの植物組織内への侵入を促し、感染対象となる植物細胞を増加させることを目的としている。しかしながら、これは従来より広く行われているリーフディスク法(Horsch et al., 1985(参考文献(19)))を発展させたものに過ぎず、新規な考え方に基づく処理法ではない。なお、効果の程度や汎用性は明らかでなく、一般的な手法として用いられていないのが現状である。

**【0006】**

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法よりも高い効率で組織を付傷することなく簡便に遺伝子導入を行うことができる、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供することである。

**【0007】**

【課題を解決するための手段】本願発明者らは、鋭意研究の結果、アグロバクテリウム属細菌を用いた遺伝子導入方法において、遺伝子導入に供する植物細胞又は植物組織を熱処理することにより、遺伝子導入効率を有意に向上させることができることを見出し本発明を完成した。

【0008】すなわち、本発明は、植物細胞又は植物組

織を熱処理することを伴う、アグロバクテリウム属細菌を介して行われる植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供する。

#### 【0009】

【発明の実施の形態】本発明の方法では、アグロバクテリウム属細菌を介した遺伝子導入方法において、遺伝子を導入する植物細胞又は植物組織を熱処理することを伴う。植物細胞又は植物組織は、熱処理し、常温まで冷却した後、アグロバクテリウム属細菌と接触させる方法であってもよいし、熱処理しながらアグロバクテリウム属細菌と接触させる方法であってもよい。また、熱処理し、常温まで冷却した後、熱処理しながらアグロバクテリウム属細菌と接触させる方法であってもよい。これらの方法のうち、好ましい方法としては、熱処理し、常温まで冷却した後、アグロバクテリウム属細菌と接触させる方法を挙げることができる。

【0010】熱処理条件は、用いる植物の種類や熱処理する細胞又は組織の量等に応じて適宜選択されるが、通常、33℃～60℃、好ましくは35℃～55℃、さらに好ましくは37℃～52℃程度の温度範囲で行われる。また、熱処理の時間は、熱処理温度、用いる植物の種類及び熱処理する細胞又は組織の種類等に応じて適宜選択されるが、通常5秒間～24時間程度である。なお、熱処理時間は、熱処理温度が高い場合には短くても遺伝子導入効率を有意に向上させることができる。例えば、熱処理温度が60℃の場合には5秒間程度の熱処理時間でも遺伝子導入効率を有意に向上させることができる場合がある。一方、熱処理温度が34℃程度の低温の場合には、数十時間の熱処理により遺伝子導入効率を有意に向上させることができる。特に好ましい熱処理条件は、37℃～52℃で1分間～24時間程度の場合が多いが、その植物細胞又は植物組織にとっての適切な熱処理条件は、ルーチンな実験により容易に設定することができる。なお、植物細胞又は植物組織を55℃以上の温度で長時間にわたって熱処理すると、植物細胞がダメージを受け、形質転換効率が低下する場合があるので、熱処理温度が55℃以上の場合には、熱処理時間を短くし、例えば3分間以下、好ましくは1分間以下程度に設定して植物細胞がダメージを受けないようにすることが好ましい。

【0011】本発明の方法は、アグロバクテリウム属細菌と接触させる植物細胞又は植物組織として熱処理したものをを用いる、又は熱処理を行いながらアグロバクテリウム属細菌と接触させることを特徴とするものであり、アグロバクテリウム属細菌を用いた遺伝子導入あるいは形質転換方法自体としては、周知の方法をそのまま適用することができる。

【0012】アグロバクテリウム属細菌を用いた植物への遺伝子導入あるいは形質転換方法自体は、この分野において周知であり、広く用いられている。

【0013】土壌細菌アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) が多くの双子葉植物に根頭癌腫病 (Crown gall disease) を引き起こすことは古くから知られており、1970年代には、Tiプラスミドが病原性に関与すること、さらにTiプラスミドの一部であるT-DNAが植物ゲノムに組み込まれることが発見された。その後このT-DNAには癌腫の誘発に必要なホルモン (サイトカイニンとオーキシン) の合成に関与する遺伝子が存在し、細菌遺伝子でありながら植物中で発現することが明らかにされた。T-DNAの切り出しと植物への伝達にはTiプラスミド上のヴィルレンス領域 (vir領域) に存在する遺伝子群が必要であり、またT-DNAが切り出されるためにはT-DNAの両端に存在するボーダー配列が必要である。他のアグロバクテリウム属細菌である *Agrobacterium rhizogenes* もRiプラスミドによる同様なシステムを有している (図3及び図4)。

【0014】アグロバクテリウムの感染によってT-DNAが植物ゲノムに組み込まれるので、T-DNA上に所望の遺伝子を挿入するとこの遺伝子も植物ゲノムに組み込まれることが期待された。しかしながら、Tiプラスミドは190kb以上と巨大であるため、標準的な遺伝子工学手法ではプラスミド上のT-DNA上に遺伝子を挿入することは困難であった。そのため、T-DNA上に外来遺伝子を挿入するための方法が開発された。

【0015】まず、腫瘍性のTiプラスミドのT-DNAからホルモン合成遺伝子が除去されたディスアーム型の菌系 (disarmed strains) であるLBA4404 (Hoekema et al., 1983 (参考文献(14))), C58C1 (pGV3850) (Zambryski et al., 1983 (参考文献(43))), GV3Ti11SE (Fraley et al., 1985 (参考文献(10))) などが作製された (図3)。これらを用いることにより、所望の遺伝子をアグロバクテリウムのTiプラスミドのT-DNA中に、あるいは所望の遺伝子を有するT-DNAをアグロバクテリウムに導入する2種類の方法が開発された。このうちの一つは、遺伝子操作が容易で所望の遺伝子の挿入が可能であり、大腸菌で複製ができる中間ベクターを、アグロバクテリウムのディスアーム型TiプラスミドのT-DNA領域中に、三系交雑法 (triparental mating) (Ditta et al., 1980 (参考文献(9))) を介して相同組換えにより導入する方法であり、中間ベクター法と呼ばれる (Fraley et al., 1985 (参考文献(10))); Fraley et al., 1983 (参考文献(11))); Zambryski et al., 1983 (参考文献(43)))、特開昭59-140885号 (EP116718))。もう一つは、バイナリーベクター (binary vector) 法とよばれるもので (図3)、T-DNAの植物への組み込みにvir領域が必要であるが、機能するために同じプラスミド上に存在する必要はないという結果 (Hoekema et al., 1983 (参考文献(14))) に基づいている。このvir領域にはvirA、virB、virC、virD、virE及びvirGが存在し、(植物バイオテクノロジー事典 (エンタプライズ株式会社発行 (1989)))、vi

vir領域とはこのvirA、virB、virC、virD、virE及びvirGの全てを含むものをいう。したがって、バイナリーベクターは、T-DNAをアグロバクテリウムと大腸菌の両方で複製可能な小さなプラスミドに組み込んだものであり、これをディスアーム型Tiプラスミドを有するアグロバクテリウムに導入して用いる。アグロバクテリウムへのバイナリーベクターの導入には、エレクトロポレーション法や三系交雑法などの方法により行うことができる。バイナリーベクターには、pBIN19(Bevan, 1984(参考文献(5))), pBI121(Jefferson, 1987(参考文献(21))), pGA482(An et al., 1988(参考文献(2))), 特開昭60-70080号(EPI20516))などがあり、これらをもとに数多くの新たなバイナリーベクターが構築され、形質転換に用いられている。また、Riプラスミドのシステムにおいても、同様なベクターが構築され形質転換に用いられている。

【0016】アグロバクテリウムA281(Watson et al., 1975(参考文献(41)))は、強病原性(super-virulent)の菌系であり、その宿主範囲は広く、形質転換効率も他の菌系より高い(Hood et al., 1987(参考文献(15))); Komari, 1989(参考文献(23)))。この特性は、A281が有するTiプラスミドのpTiBo542によるものである(Hood et al., 1984(参考文献(18))); Jin et al., 1987(参考文献(22)); Komari et al., 1986(参考文献(26)))。

【0017】pTiBo542を用いて、これまでに2つの新しいシステムが開発されている。一つはpTiBo542のディスアーム型のTiプラスミドを有する菌系EHA101(Hood et al., 1986(参考文献(17)))およびEHA105(Hood et al., 1993(参考文献(16)))を用いたものであり、これらを上述のバイナリーベクターシステムに適用することにより、形質転換能力の高いシステムとして種々の植物の形質転換に利用されている。もう一つは、スーパーバイナリーベクター('super-binary' vector)(Hiei et al., 1994(参考文献(13))); Ishida et al., 1996(参考文献(20)); Komari et al., 1999(参考文献(28))、W094/00977号、W095/06722号)システムである(図4)。このシステムは、vir領域(virA、virB、virC、virD、virE及びvirG(以下、これらをそれぞれ「vir断片領域」ということもある。))を持つディスアーム型のTiプラスミドおよびT-DNAを有するプラスミドからなることから、バイナリーベクターシステムの一つである。しかしながら、T-DNAを有する側のプラスミド、即ちバイナリーベクターにvir断片領域のうち、少なくとも一つのvir断片領域を実質的に取除いたvir領域の断片(このうち好ましくは少なくともvirB又はvirGを含む断片、さらに好ましくはvirB及びvirGを含む断片)を組み込んだ(Komari, 1990a(参考文献(24)))スーパーバイナリーベクターを用いる点で異なる。なお、スーパーバイナリーベクターを有するアグロバクテリウムに、所望の遺伝子を組み込んだT-DNA領域を導入するには、三系交雑法を介した相同組換

えが容易な手法として利用できる(Komari et al., 1996(参考文献(27)))。このスーパーバイナリーベクターシステムは、上述の種々のベクターシステムと比べて、多くの植物種で非常に高い形質転換効率をもたらすことが明らかとなっている(Hiei et al., 1994(参考文献(13))); Ishida et al., 1996(参考文献(20)); Komari, 1990b(参考文献(25)); Li et al.(参考文献(29)), 1996; Sai to et al., 1992(参考文献(37)))。

【0018】本発明の方法においては、宿主となるアグロバクテリウム属細菌としては、特に限定されないが、*Agrobacterium tumefaciens* (例えば上述の*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404(Hoekema et al., 1983(参考文献(14)))およびEHA101(Hood et al., 1986(参考文献(17)))を好ましく用いることができる。

【0019】本発明の方法によれば、アグロバクテリウム属細菌における病原性(vir)領域の遺伝子群の発現に基づく遺伝子導入系であれば、特に限定されることなく有意な効果を得ることができる。したがって、上述の中間ベクター、バイナリーベクター、強病原性のバイナリーベクター、スーパーバイナリーベクターなどいずれのベクターシステムに対しても用いることができ、本発明による効果を得ることができる。これらのベクター類を改変した異なるベクターシステムを用いた場合においても同様である(例えば、アグロバクテリウム属細菌のvir領域の一部または全部を切り出し付加的にプラスミド中に組み込む、vir領域の一部または全部を切り出し新たなプラスミドの一部としてアグロバクテリウムに導入するなど)。また、当然ではあるが本発明の方法によれば、野生型のアグロバクテリウム属細菌においても、植物へ野生型のT-DNA領域の導入効率を高め、事実上感染効率を向上することができる。

【0020】植物に導入しようとする所望の遺伝子は、上記プラスミドのT-DNA領域中の制限酵素部位に常法により組み込むことができ、当該プラスミドに同時に若しくは別途組込んだカナマイシン、パロモマイシン等の薬剤に対する耐性を有する遺伝子等の適当な選択マーカーに基づいて選択することができる。大型で多数の制限部位を持つものは、通常のサブクローニングの手法では所望のDNAをT-DNA領域内に導入することが必ずしも容易でないことがある。このような場合には、三系交雑法により、アグロバクテリウム属細菌の細胞内での相同組換えを利用することで目的のDNAを導入することができる。

【0021】また、プラスミドを*Agrobacterium tumefaciens*等のアグロバクテリウム属細菌に導入する操作は従来法により行うことができ、例としては、上記した三系交雑法やエレクトロポレーション法、エレクトロインジェクション法、PEGなどの化学的な処理による方法などが含まれる。

【0022】植物に導入しようとする遺伝子は、従来の技術と同様に基本的にはT-DNAの左右境界配列の間に配

置されるものである。しかし、プラスミドが環状であるため、境界配列の数は1つでもよく、複数の遺伝子を異なる部位に配置しようとする場合には、境界配列が3個以上あってもよい。また、アグロバクテリウム属細菌中で、TiまたはRiプラスミド上に配置されてもよく、または他のプラスミド上に配置されてもよい。さらには、複数の種類のプラスミド上に配置されてもよい。

【0023】アグロバクテリウム属細菌を介して遺伝子導入を行う方法は、植物細胞又は植物組織をアグロバクテリウム属細菌と単に接触させることにより行うことができる。例えば、 $10^6 \sim 10^{11}$ 細胞/ml程度の細胞濃度のアグロバクテリウム属細菌懸濁液を調製し、この懸濁液中に植物細胞又は植物組織を3～10分間程度浸漬後、固体培地上で数日間共存培養することにより行うことができる。

【0024】遺伝子導入に供される細胞又は組織は、何ら限定されるものではなく、葉、根、茎、実、その他いずれの部位であってもよいし、カルスのような脱分化したものであってもよい。また、植物の種類も何ら限定されないが、被子植物が好ましく、被子植物ならば双子葉植物でも単子葉植物でもよい。

【0025】下記実施例において具体的に示されるように、本発明の方法によれば、従来のアグロバクテリウム法に比較して、遺伝子導入の効率が有意に向上する。また、従来からアグロバクテリウム法により遺伝子導入が可能であった植物の遺伝子導入効率が向上するだけではなく、従来のアグロバクテリウム法によっては遺伝子導入することができなかった植物に対しても本発明の方法により遺伝子導入が初めて可能になった。従って、本発明における「遺伝子導入の効率の向上」には、従来の方法では遺伝子導入が不可能であったものを可能にすることも包含される（すなわち、従来0%であった遺伝子導入効率を向上させたと考える）。

#### 【0026】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

#### 【0027】実施例1

##### (1) 供試組織および供試菌系

ジャボニカイネの朝の光およびインディカイネのIR72を供試品種とし、未熟胚および未熟胚由来のカルスを材料として用いた。供試未熟胚は、開花後1～2週間の未熟種子から採取し、Hiei et al., 1994(参考文献(13))の方法により調製した。すなわち、開花後、7～12日目の未熟種子を頤を除去した後、70% エタノールに30秒、1%次亜塩素酸ナトリウムに10分間浸漬することにより消毒した後、未熟胚を取り出し供試材料とした。また、未熟胚由来カルスは、未熟胚を4g/l Gelriteを含む2N6培地(Hiei et al., 1994(参考文献(13)))上で2週間培

養することにより得た。

【0028】アグロバクテリウムの菌系及びプラスミドベクターとして、LBA4404(pIG121Hm)(Hiei et al., 1994(参考文献(13)))、LBA4404(pNB131)(図2参照)、LBA4404(pTOK233)(Hiei et al., 1994(参考文献(13)))を用いた。

【0029】pNB131の構築は、以下のように行った。pSB31(Ishida et al., 1996(参考文献(20)))を大腸菌LE392株に導入した後、Triparental mating法(Ditta et al., 1980(参考文献(9)))により、pNB1(Komari et al., 1996(参考文献(27)))を有するアグロバクテリウムLBA4404株に導入した。アグロバクテリウム内でpNB1とpSB31の間の相同組換えによりpNB131を得た。

【0030】pIG121HmのT-DNA領域には、ノバリン合成酵素(nos)遺伝子のプロモーターにより制御されるカナマイシン耐性(nptII)遺伝子、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35Sプロモーターにより制御されるハイグロマイシン耐性(hpt)遺伝子、35Sプロモーターにより制御されトマのカタラーゼ遺伝子のイントロンが介在するGUS遺伝子(Ohta et al., 1990(参考文献(33)))を有する。

【0031】pNB131のT-DNA領域には、35Sプロモーターにより制御されるbar遺伝子、35Sプロモーターにより制御されイントロンが介在するGUS遺伝子(上述)を有する。

【0032】pTOK233のT-DNA領域には、nosプロモーターにより制御されるnptII遺伝子、35Sプロモーターにより制御されるhpt遺伝子、35Sプロモーターにより制御されイントロンが介在するGUS遺伝子(上述)を有する。pTOK233は形質転換能力が高いスーパーバイナリーベクター(Komari et al., 1999(参考文献(28)))である。

#### 【0033】(2) 熱処理

供試組織(5～200 mg)を1 mlの滅菌水の入ったチューブに浸漬した。チューブを各処理温度に設定したウォーターバスに1分～数十時間浸漬することにより熱処理を行った。対照処理区は、室温(25℃)で静置することによった。熱処理終了後、チューブを流水で冷却した。

#### 【0034】(3) 接種および共存培養

熱処理後、チューブ内部の滅菌水を除き、アグロバクテリウムの懸濁液を加え、5～30秒間ボルテックスミキサーにより攪拌した。バクテリア懸濁液の調製はHiei et al. (1994)((参考文献(13)))によった。すなわち、A B培地(Chilton M-D et al., 1974(参考文献(8)))上で3～10日間培養したアグロバクテリウムのコロニーを白金耳でかきとり、修正AA培地(AA主要無機塩類、AAアミノ酸及びAAビタミン類(Toriyama K, 1985(参考文献(38)))、MS微量塩類(Murashige T., 1962(参考文献(32)))、1.0 g/l カザミノ酸、100 μMアセトシリシリンゴン、0.2 M ショ糖、0.2 M グルコース)に懸

濁した。また、懸濁液の菌密度は、約 $0.3 \sim 1 \times 10^9$  cfu/mlに調整した。約5分間室温で静置した後、共存培養用の培地に置床した。未熟胚の共存培養の培地には、8 g/l アガロースを培地固化剤とした2N6-AS (Hiei et al. 1994(参考文献(13)))を用いた。カルスの共存培養の培地には、4 g/l Gelriteを含む2N6-AS (Hiei et al. 1994(参考文献(13)))を用いた。25℃、暗黒下で3~7日間共存培養した後、未熟胚またはカルスの一部を、Hieiら(1994)(参考文献(13))の方法によりX-Gluc処理によるGUS遺伝子の発現調査に供した。すなわち、共存培養処理直後、組織を0.1% Triton X-100を含む0.1 M リン酸緩衝液(pH6.8)に浸漬し、37℃で1時間静置した。リン酸緩衝液でアグロバクテリウムを除去した後、1.0 mM 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-グルクロン酸(X-gluc)および20% メタノールを含むリン酸緩衝液を添加した。37℃で24時間処理した後、青色の呈色を示す組織を顕微鏡下で観察した。

【0035】(4) 日本稲における形質転換細胞の選抜共存培養後、未熟胚については肥大生長した胚盤部位をメスにより4~7分割した後、カルスについては分割は行わずに、選抜薬剤を含まない2N6培地(上述)で数日間30℃明条件下で培養した。次に、50~100 mg/l ハイグロマイシン、200mg/l パロモマイシンのいずれかを含む2N6培地上に移植し、30℃明条件下で約2~3週間培養した。なお、10mg/l フォスフィノスリシン(PPT)を選抜薬剤に含む培地には、2 mg/l の2,4-Dを含みココナツ水を除いたCC培地(Potrykus et al. 1979(参考文献(34)))を用いた。培地上に形成された薬剤耐性カルスを、それぞれ同濃度の選抜薬剤を含むN6-7培地(Hiei et al. 1994(参考文献(13)))に移植し、7日間30℃明条件下で2次選抜を行った。各培地には250 mg/l セフォタキシムと250 mg/l カルベニシリン二ナトリウムを組み合わせてもしくは250 mg/l セフォタキシムを単独で添加した。また培地固化剤には、4g/l Gelriteを用いた。培地上で増殖した薬剤耐性カルスにX-Gluc処理を行い、GUS遺伝子の発現を調査した。

【0036】(5) 結果  
各種処理温度で未熟胚を10分間処理し、LBA4404(pTOK23)との共存培養を行い、GUS遺伝子の一過性発現を調査した結果を表1および表2に示した。無処理区に比べ46℃前後の熱処理をした場合に、胚盤におけるGUS発現領域は明らかに広く、より高頻度で遺伝子導入が生じたものと理解された。一方、52℃以上の熱処理は植物組織にダメージを与えることがあり、55℃処理では未熟胚の生長を抑制し、GUS発現も観察されなかった。10分間の短時間処理では、43℃試験区における明瞭なGUS発現領域の拡大は認められなかった。

【0037】イネ未熟胚とアグロバクテリウムを共存培養した後、選抜薬剤を含む培地上で培養して得られた形質転換カルスの選抜結果を表3および表4に示した。LB

A4404(pIG121Hm)を接種した試験では、熱処理していない未熟胚の分割切片からは、12.0 %の効率でハイグロマイシン耐性かつ一様なGUS遺伝子の発現を示す形質転換カルスが得られた(表4)。これに対し、46℃、5分間の熱処理を行った未熟胚の分割切片では、形質転換カルスが29 %の効率で得られた(表3)。また、パロモマイシンによる選抜では、熱処理していない未熟胚の切片からは、2.0 %の低効率で形質転換カルスが得られたのに対し、46℃、5分間の熱処理を行った未熟胚切片では、12.0 %の効率で得られた(表4)。LBA4404(pNB131)を接種した試験では、熱処理していない未熟胚の切片からは、29.0 %の効率でPPT耐性かつ一様なGUS遺伝子の発現を示す形質転換カルスが得られた(表5)。これに対し、46℃、5分間の熱処理を行った未熟胚の切片では、形質転換カルスが50.0%の効率で得られた(表5)。いずれも未熟胚への熱処理により、顕著な形質転換効率の向上が認められた。

【0038】イネ未熟胚由来カルスとアグロバクテリウムLBA4404(pTOK233)を共存培養した後、ハイグロマイシンを含む培地上で培養して得られた形質転換カルスの選抜結果を表6に示した。熱処理していないカルスからは、24.1 %の効率でハイグロマイシン耐性かつ一様なGUS遺伝子の発現を示す形質転換カルスが得られた(表6)。これに対し、46℃、3分もしくは10分間の熱処理を行ったカルスでは、形質転換カルスが36.2~36.9 %の効率で得られた(表6)。以上のように、イネカルスへの熱処理においても、顕著な形質転換効率の向上が認められた。

【0039】未熟胚およびカルスを用いて、共存培養後のGUS発現を指標に処理温度と処理時間の関係についてさらに検討を加えたところ、より高温の場合には短時間の処理が、比較的低い温度の場合には長時間の処理が、遺伝子導入の効率を高めた。すなわち、60℃の熱処理区では数秒の処理により、35℃では数時間から数十時間の処理により、遺伝子導入効率を向上させる明瞭な効果が認められた。

【0040】Hiei et al. (1994)(参考文献(13))は、イネのカルスを材料として比較的高い効率で形質転換が行うことができることを報告している。また、Aldemita et al., 1996(参考文献(1))は、イネの未熟胚を用いた形質転換例を報告している。これらの形質転換手法をより効率よく安定して実施するために、上述した熱処理法は非常に有効である。特に、未熟胚は栽培環境に左右されやすく形質転換に好適な未熟胚材料を常時得ることは容易ではないが、熱処理を施すことにより安定した高い形質転換効率を維持することが可能である。Hiei et al. (1994)(参考文献(13))は、形質転換能力の高いベクターであるスーパーバイナリーベクターがイネの形質転換効率を向上させることを示した。また、Aldemita and Hodges (1996)(参考文献(1))によれば、スー

パーバイナリーベクターのLBA4404(pTOK233)を用いた試験においてのみ、形質転換体を得ている。本研究における熱処理法は、通常のバイナリーベクターを用いた場合においても、スーパーバイナリーベクターに匹敵するか、それ以上の遺伝子導入効率を得ることができる。また、スーパーバイナリーベクターと熱処理法を併用することにより、より一層効率を向上させることが可能であ

る。さらに、熱処理法を用いることにより、これまで全く形質転換体を得ることができなかった品種においても形質転換体を得ることができるものと推察される。

【0041】

【表1】表1 処理温度と未熟胚盤におけるGUS遺伝子の一過性発現（品種：IR72）

処理温度	供試未熟胚数	未熟胚数						
		胚盤表面におけるGUS発現領域の割合 (%)						
		0	0-1	1-10	10-20	20-50	50-80	80-100
無処理 (室温)	20	1	6	12	1	0	0	0
43℃	20	1	5	12	2	0	0	0
46℃	20	0	0	3	3	7	6	1

供試菌系：LBA4404(pTOK233)，熱処理時間：10分，共存培養期間：4日

【0042】

【表2】表2 処理温度と未熟胚盤におけるGUS遺伝子の一過性発現（品種：朝の光）

処理温度	供試未熟胚数	未熟胚数						
		胚盤表面におけるGUS発現領域の割合 (%)						
		0	0-1	1-10	10-20	20-50	50-80	80-100
無処理 (室温)	20	0	2	13	3	2	0	0
43℃	20	0	1	9	2	7	1	0
46℃	20	0	0	1	3	9	6	1
49℃	20	0	1	8	5	6	0	0
52℃	20	3	4	4	2	6	1	0
55℃	20	0	0	0	0	0	0	0

供試菌系：LBA4404(pTOK233)，熱処理時間：10分，共存培養期間：3日

【0043】

【表3】表3 未熟胚への熱処理と形質転換カルスの選抜効率（品種：朝の光）

処理	供試未熟胚切片数 (A)	Hm耐性GUS陽性カルス数 (B)	B/A (%)
無処理 (室温)	50	6	12.0
46℃ 5分	51	15	29.4

供試菌系：LBA4404(pIG121Hm)，共存培養期間：5日，Hm：ハイグロマイシン

【0044】

【表4】表4 未熟胚への熱処理と形質転換カルスの選抜効率（品種：朝の光）



	供試未熟胚	Pm耐性GUS陽性	B/A (%)
処理	切片数 (A)	カルス数 (B)	
無処理 (室温)	50	1	2.0
46℃ 5分	50	6	12.0

供試菌系: LBA4404(pIG121Hm), 共存培養期間: 5日, P  
m: パロモマイシン  
【0045】

【表5】表5 未熟胚への熱処理と形質転換カルスの選抜効率 (品種: 朝の光)

	供試未熟胚	PPT耐性GUS陽性	B/A (%)
処理	切片数 (A)	カルス数 (B)	
無処理 (室温)	62	18	29.0
46℃ 5分	64	32	50.0

供試菌系: LBA4404(pNB131), 共存培養期間: 6日  
【0046】

【表6】表6 カルスへの熱処理と形質転換カルスの選抜効率 (品種: 朝の光)

	供試カルス	Hm耐性GUS陽性	B/A (%)
処理	数(A)	カルス数 (B)	
無処理 (室温)	133	32	24.1
46℃ 3分	111	41	36.9
46℃ 10分	105	38	36.2

供試菌系: LBA4404(pTOK233), 共存培養期間: 3日  
【0047】実施例2  
大きさ約1.2 mmのトウモロコシ未熟胚 (品種A188、農林水産省生物資源研究所より入手) を無菌的に取り出し、LS-inf液体培地を含む2 mlのチューブに入れた。同液体培地で一回洗浄した後、新たに同液体培地2.0 mlを加えた。46℃のウォーターバスにチューブを1 - 10分間浸漬した。対照は、室温で同時間静置した。培地を除き、100 mMのアセトシリンゴンを含むLS-inf液体培地に約1 x 10<sup>9</sup> cfu/mlの濃度で、Agrobacterium tumefaciens LBA4404(pIG121Hm)、EHA101(pIG121Hm)、LBA4404(pTOK233) (以上、Hiei et al., 1994(参考文献(13))に記載)、LBA4404(pSB131) (Ishida et al., 1996(参考文献(20)))またはLBA4404(pNB131) (実施例1及び図2に記載) を懸濁した液1.0 mlを加え、30秒間ボルテックスミキサーにより攪拌した。5分間室温で静置した後、胚軸面が培地に接するように10 μM AgNO<sub>3</sub>を含むLS-AS培地に置床した。25℃、暗黒下で3日間培養した後、一部の未熟胚を採取し、X-glucによりGUS遺伝子のトランジェントな発現を調査した。LBA4404(pSB131)及びLBA4404(pNB131)を接種した未熟胚については、共存培養後、フォスフィノスリシン(PPT)及び10 μM AgNO<sub>3</sub>を含む培地で培養し、形質転換細胞の選抜を行った。選抜培地上で増殖し

たカルスをPPTを含む再分化培地に置床し、形質転換植物の再分化を行った。再分化した植物の葉の一部を切り取り、実施例1と同様にしてX-glucによりGUS遺伝子の発現を調査した。なお、上記の培地および培養法は、Ishida et al. 1996 (参考文献(20))に記載の方法に従った。pSB131とpTOK233は形質転換能力の高いスーパーバイナリーベクターである。

【0048】46℃で1 - 10分間処理した未熟胚にLBA4404(pSB131)を接種したときのGUS遺伝子のトランジェントな発現の結果を表7に示す。無処理の対照を含め試験に供した全ての未熟胚でGUS遺伝子の発現が認められた。しかし、その発現部位は対照に比べ熱処理した場合に強く見られた。特に3分間以上熱処理した場合には、未熟胚の胚盤表面の広い部位でGUS遺伝子の発現を示すものが多く見られた。アグロバクテリウムの種々の菌株を接種したときのGUS遺伝子のトランジェントな発現の結果を表8に示す。熱処理した未熟胚ではいずれの菌株を接種した場合でも、全ての未熟胚がGUS遺伝子の発現を示した。これに対し、無処理の未熟胚では、いずれの菌株でも熱処理した場合に比べ弱い発現を示した。特に強病原性の遺伝子をもたない通常のバイナリーベクターであるLBA4404(pIG121Hm)およびLBA4404(pNB131)を接種した場合には、ほとんどの未熟胚がGUS遺伝子の発現を全く

示さなかった。

【0049】スーパーバイナリーベクターであるLBA4404(pSB131)を接種したA188未熟胚での形質転換結果を表9に示す。熱処理していない対照の未熟胚からは、10.7%の効率で形質転換植物が得られた。これに対し、46℃、3分間の熱処理を行った未熟胚では、形質転換効率は20%で、無処理の約2倍に効率が向上した。強病原性の遺伝子をもたない通常のバイナリーベクターであるLBA4404(pNB131)を接種したA188未熟胚での形質転換結果を表4に示す。熱処理していない対照の未熟胚からは、形質転換植物は得られなかった。これに対し、46℃、5分間の熱処理を行った未熟胚では、2個体の独立な形質転換植物が得られた。形質転換効率は2.4%であった。

【0050】以上の結果から、スーパーバイナリーベクターを用いた場合、材料の未熟胚を接種前に熱処理することにより、従来法に比べ遺伝子導入効率が増大し、また、形質転換効率も向上することが明らかとなった。さらに、今までにトウモロコシでは成功例のない通常のバイナリーベクターにおいても熱処理することにより初めて形質転換植物が得られた。これらのことから、従来のアグロバクテリウム法では形質転換できなかったA188以

外のトウモロコシ品種 (Ishida et al. 1996(参考文献(20))) についても熱処理することにより形質転換植物の得られる可能性が示唆された。

【0051】

【表7】表7 熱処理時間の遺伝子導入効率に及ぼす影響 (LBA4404(pSB131)を接種)

46℃処理 時間(min)	供試 未熟胚	G U S			
		+++	++	+	-
0	19	0	1	18	0
1	20	0	2	18	0
3	20	2	5	13	0
5	20	1	5	14	0
10	20	5	3	12	0

共存培養後の未熟胚でのGUS遺伝子のトランジェントな発現の結果

【0052】

【表8】表8 熱処理の遺伝子導入効率に及ぼす影響

接種菌株	処理	供試 未熟胚	G U S			
			+++	++	+	-
LBA4404 (pIG121Hm)	46℃ 5 min	12	0	3	9	0
	無処理	12	0	1	2	9
EHA101 (pIG121Hm)	46℃ 5 min	14	2	9	3	0
	無処理	13	0	3	9	1
LBA4404 (pTOK233)	46℃ 5 min	15	9	6	0	0
	無処理	16	0	6	10	0
LBA4404 (pNB131)	46℃ 5 min	15	0	2	13	0
	無処理	15	0	0	2	13

共存培養後の未熟胚でのGUS遺伝子のトランジェントな発現の結果

【0053】

処理	供試 未熟胚数	PPT 耐性 カルス (%)	PPT 耐性 植物 (%)	GUS+ 植物 (%)
46℃ 3 min	30	18 (60.0)	15 (50.0)	6 (20.0)
無処理	28	9 (32.1)	9 (32.1)	3 (10.7)

カルス数、植物数はいずれもクローンを含まない。

【0054】

【表9】表9 熱処理の形質転換効率に及ぼす影響 (LBA4404(pSB131)を導入)

【表10】表10 熱処理の形質転換効率に及ぼす影響 (LBA4404(pNB131)を導入)

	供試	トランジェン	PPT耐性	PPT耐性	GUS+
処理	未熟胚数	トGUS+ %	カルス (%)	植物 (%)	植物 (%)
46℃ 5 min	84	71.4	7 (8.3)	2 (2.4)	2 (2.4)
無処理	20	0	0	0	0

カルス数、植物数はいずれもクローンを含まない。トランジェント発現は、共存培養後一部のカルスを採取して調査した。

#### 【0055】実施例3

クリーピングベントグラス (*Agrostis palustris* cv. *P. encross*, 雪印種苗 (株)) の完熟種子を滅菌後、MS無機塩、MSビタミン、4 mg/l dicamba、0.5 mg/l 6BA、0.7 g/l アロリン、0.5 g/l MES、20 g/l ショ糖、3 g/l gelrite (pH5.8) を含む培地 (TG2培地) に置床し、25℃、暗黒下で培養した。誘導されたカルスを同組成の培地で継代培養し、エンブリオジェニックなカルスを増殖した。継代後、2-3週間目のカルス約0.3gをTG2L培地を含む2 mlのチューブに入れた。同液体培地で一回洗浄した後、新たに液体培地2 mlを加えた。46℃のウォーターバスにチューブを5分間浸漬した。対照は、室温で同時間静置した。培地を除き、100  $\mu$ Mのアセトシリンゴンを含むTG2-inf培地 (TG2培地からアロリン、MES、gelriteを除き、48.46 g/l ショ糖、36.04 g/l グルコースを添加 (pH 5.2)) に約  $1 \times 10^9$  cfu/mlの濃度で、LBA4404 (pTOK233) (Hiei et al., 1994 (参考文献(13))) を懸濁した液1.0 mlを加え、30秒間ボルテックスミキサーにより攪拌した。5分間室温で静置した後、TG2L培地に10 g/l グルコース、100  $\mu$ Mアセトシリンゴン、4 g/l タイプI アガロース (pH5.8) を添加した培地 (TG2-AS培地) に置床した。25℃、暗黒下で3日間培養した後、一部のカルスを採取し、実施例1と同様にしてX-glucによりGUS遺伝子のトランジェントな発現を調査した。

【0056】LBA4404 (pTOK233) を接種したカルスでのGUS遺伝子のトランジェントな発現を表11に示す。熱処理していない対照のカルスでは、全く発現を示さなかったのに対し、熱処理した場合、25%のカルスでGUS遺伝子のトランジェントな発現が認められた。

【0057】今までに報告されているシバの形質転換はパーティクルガン (Zhong et al. 1993 (参考文献(44))), Hartman et al. 1994 (参考文献(12))), Xiao and Ha 1997 (参考文献(42))) やエレクトロポレーション (Asano and Ugaki 1994 (参考文献(3))), Asano et al. 1998 (参考文献(4))) による直接導入法によるもので、アグロバクテリウムによる形質転換の成功例はみられない。本実施例でもみられたように、従来法による遺伝子導入の効率の低さが、アグロバクテリウム法によるシバの形質転換を困難にしている原因であれば、高頻度で遺伝子導入のなされる本願発明の熱処理により、形質転換植物

の得られる可能性が示された。

#### 【0058】

【表11】表11 シバカルスへの遺伝導入結果 (LBA4404 (pTOK233) を接種)

	供試	GUS+
処理	カルス	カルス (%)
46℃ 5 min	20	5 (25.0)
無処理	20	0

#### 【0059】実施例4

##### (1) 供試組織および供試菌系

タバコ品種ブライトイエロー2号の懸濁培養細胞株BY2を供試材料として用いた。懸濁培養細胞は0.2mg/l 2,4-Dを含むLS液体培地で25℃暗条件下で培養し、1週間毎に継代することにより維持した。アグロバクテリウムおよびそのベクターには、LBA4404 (pTOK233) (Hiei et al., 1994 (参考文献(13))) を用いた。

##### 【0060】(2) 熱処理

継代後4日目の懸濁培養細胞約0.3gを1 mlの滅菌水の入ったチューブに浸漬した。チューブを43℃または46℃に設定したウォーターバスに10分～20分浸漬することにより熱処理を行った。対照処理区は、室温 (25℃) で静置することによった。熱処理終了後は、チューブを流水で冷却した。

##### 【0061】(3) 接種および共存培養

懸濁培養細胞へのアグロバクテリウムの接種および共存培養は、Komari (1989) (参考文献(23)) の方法により実施した。25℃暗黒下で2日間共存培養した後、懸濁培養細胞を、Hiei et al. (1994) (参考文献(13)) の方法により実施例1と同様にしてX-Gluc処理によるGUS遺伝子の発現調査に供した。

##### 【0062】(4) 結果

懸濁培養細胞を熱処理し、LBA4404 (pTOK233) との共存培養を行い、GUS遺伝子の一過性発現を調査した結果を表12に示した。無処理区に比べ熱処理をした場合に、GUS発現を示す細胞の頻度は明らかに高く、より高頻度で遺伝子導入が生じたものと理解された。熱処理は、イネ、トウモロコシおよびシバなどの単子葉植物だけではなく、双子葉植物への遺伝子導入にも効率を向上させる効果があることが確認された。

#### 【0063】

【表12】表12 処理温度と懸濁培養細胞BY2におけ

## るGUS遺伝子の一過性発現

処理温度	処理時間	GUS発現を示した細胞の頻度*
無処理 (室温)	—	+
43℃	10分	++
43℃	20分	+++
46℃	10分	+++

\* +: 低い, ++: やや高い, +++: 高い

供試菌系: LBA4404(pTOK233), 共存培養期間: 2日

## 【0064】

【発明の効果】本発明により、従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法よりも高い効率で、組織を付傷することなく簡便に遺伝子導入を行うことができる、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法が提供された。本発明の方法は、単子葉植物に対しても双子葉植物に対しても適用可能である。また、シバのように、従来のアグロバクテリウム法では形質転換することができなかった植物も、本発明の方法により形質転換が可能になった。

## 【0065】参考文献

- (1) Aldemita RR, Hodges TK (1996) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of japonica and indica rice varieties. *Planta* 199: 612-617
- (2) An, G., Evert, P.R., Mitra, A. and Ha, S.B. (1988) Binary vectors. In Gelvin, S.B. and Schilperoort, R.A. (eds.), *Plant Molecular Biology Manual A* 3. Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp. 1-19.
- (3) Asano, Y., Ugaki, M. (1994) Transgenic plants of *Agrostis alba* obtained by electroporation-mediated direct gene transfer into protoplasts. *Plant Cell Reports* 13:243-246.
- (4) Asano, Y., Ito, Y., Fukami, M., Sugiura, K., Fujiie, A. (1998) Herbicide-resistant transgenic creeping bentgrass plants obtained by electroporation using an altered buffer. *Plant Cell Reports* 17:963-967.
- (5) Bevan, M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.*, 12, 8711-8721.
- (6) Bidney, D., Scelonge, C., Martich, J., Burrus, M., Sims, L., and Huffman G. (1992) Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.*, 18, 301-313
- (7) Chan, M-T., Cheng, H-H., Ho, S-L., Tong, W-F. and Yu, S-M. (1993) *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric  $\alpha$ -amylase promoter/ $\beta$ -glucuronidase gene.
- (8) Chilton, M-D., Currier, TC., Farrand, SK., Bendich, AJ., Gordon MP. & Nester, EW. (1974) *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71:3672-3676.
- (9) Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. and Helinski, D.R. (1980) Broadhost range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 7347-7351.
- (10) Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Eichholtz, D.A. and Flick, J.S. (1985) The SEV system: a new disarmed Ti plasmid vector for plant transformation. *Bio/technology*, 3, 629-635.
- (11) Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M. L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L. and Woo, S.C. (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80, 4803-4807.
- (12) Hartman, C.L., Lee, L., Day, P.R., Tumer, N. E. (1994) Herbicide resistant turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.) by biolistic transformation. *Biotechnology* 12:919-923.
- (13) Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6, 271-282.
- (14) Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J. and Schilperoort, R.A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 303, 179-180.
- (15) Hood, E.E., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D. (1987) Virulence of *Agrobacterium tumefaciens* strain A281 on legumes. *Plant Physiol*, 83, 529-534.
- (16) Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S. and Hoekema, A. (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res.*, 2, 208-218.
- (17) Hood, E.E., Helmer, G.L., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D. (1986) The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.*, 168, 1291-1301.
- (18) Hood, E.E., Jen, G., Kayes, L., Kramer, J., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D. (1984) Restriction endonuclease map of pTiBo542, a potential Ti-plasmid vector for genetic engineering of plants. *Bio/technology*, 2, 100-103.

technology, 2, 702-709.

(19) Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rpgers, S. G. and Fraley, R. T. (1985)

A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, 1229-1231.

(20) Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. and Kumashiro, T. (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnol.* 14, 745-750.

(21) Jefferson, R.A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 5, 387-405.

(22) Jin, S., Komari, T., Gordon, M.P. and Nester, E.W. (1987) Genes responsible for the supervirulence phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A281. *J. Bacteriol.*, 169, 4417-4425.

(23) Komari, T. (1989) Transformation of callus cultures of nine plant species mediated by *Agrobacterium*. *Plant Sci.*, 60, 223-229.

(24) Komari, T. (1990a) Genetic characterization of double-flowered tobacco plant obtained in a transformation experiment. *Theor. Appl. Genet.*, 80, 167-171.

(25) Komari, T. (1990b) Transformation of cultured cells of *Chenopodium quinoa* by binary vectors that carry a fragment of DNA from the virulence region of pTiBo542. *Plant Cell Reports*, 9, 303-306.

(26) Komari, T., Halperin, W. and Nester, E.W. (1986) Physical and functional map of supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmid pTiBo542. *J. Bacteriol.*, 166, 88-94.

(27) Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. and Kumashiro, T. (1996) Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J.* 10, 165-174.

(28) Komari, T. and Kubo, T. (1999) Methods of Genetic Transformation: *Agrobacterium tumefaciens*. In Vasil, I.K. (ed.) *Molecular improvement of cereal crops*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 43-82.

(29) Li, H.-Q., Sautter, C., Potrykus, I. and Puntieri-Kaerlas, J. (1996) Genetic transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Nature Biotechnol.*, 14, 736-740.

(30) Lindsey, K., Gallois, P. and Eady, C. (1991) Regeneration and transformation of sugarbeet by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Tissue Culture Manual*

187:1-13. Kluwer Academic Publishers.

(31) McCormick, S. (1991) Transformation of tomato with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Tissue Culture Manual* B6:1-9. Kluwer Academic Publishers.

(32) Murashige, T. and Skoog, F. (1962) *Physiol. Plant* 15:473-497.

(33) Ohta, S., Mita, S., Hattori, T., Nakamura, K., (1990) Construction and expression in tobacco of a  $\beta$ -glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol.* 31:805-813.

(34) Potrykus, I., Harms, C. T. and Lorz, H. (1979) Callus formation from cell culture protoplasts of corn (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* 54:209-214.

(35) Potrykus, I., Bilang, R., Futterer, J., Sautter, C. and Schrott, M. (1998) *Agricultural Biotechnology*, NY: Marcel Dekker Inc. pp. 119-159.

(36) Rogers, S.G., Horsch, R.B. and Fraley, R. T. (1988) Gene transfer in plants: Production of transformed plants using Ti plasmid vectors. *Method for Plant Molecular Biology*, CA: Academic Press Inc. pp. 423-436.

(37) Saito, Y., Komari, T., Masuta, C., Hayashi, Y., Kumashiro, T. and Takanami, Y. (1992) Cucumber mosaic virus-tolerant transgenic tomato plants expressing a satellite RNA. *Theor. Appl. Genet.*, 83, 679-683.

(38) Toriyama, K. and Hinata, K. (1985) *Plant Sci.*, 41:179-183.

(39) Trick, H.N. and Finer, J.J. (1997) SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. *Transgenic Research* 6:329-336.

(40) Visser, R.G.F. (1991) Regeneration and transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Tissue Culture Manual* B5:1-9. Kluwer Academic Publishers.

(41) Watson, B., Currier, T.C., Gordon, M.P., Chilton, M.-D. and Nester, E.W. (1975) Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 123, 255-264.

(42) Xiao, L., Ha, S.-B. (1997) Efficient selection and regeneration of creeping bentgrass transformants following particle bombardment. *Plant Cell reports* 16:874-878.

(43) Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.

(44) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Stiklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. *Plant Cell Reports* 13:1-6.

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の方法に好ましく用いることができるスーパーバイナリーベクターの例であるpTOK233の構築方法を示す図である。

【図2】本発明の方法に好ましく用いることができるバイナリーベクターの例であるpNB131の遺伝子地図を示す図である。

【図3】アグロバクテリウム属細菌の主要な2種類のベクターシステムである中間ベクターシステムとバイナリーベクターシステムの構築過程を示す模式図である。

【図4】アグロバクテリウム ツメファシエンスの強病原性菌株A281に由来する2種類のバイナリーベクターシステムを示す模式図である。

【符号の説明】

BL アグロバクテリウム属細菌のT-DNAの左ボーダー配列

BR アグロバクテリウム属細菌のT-DNAの右ボーダー配列

TC テトラサイクリン抵抗性遺伝子

SP スペクチノマイシン抵抗性遺伝子

IG イントロンGUS遺伝子

HPT ハイグロマイシン抵抗性遺伝子

NPT カナマイシン抵抗性遺伝子

K 制限酵素KpnI部位

H 制限酵素HindIII 部位

Amp<sup>r</sup> アンピシリン耐性遺伝子

BAR bar遺伝子

COS, cos ラムダファージのCOS部位

ORI, ori ColE1の複製開始点

P35S CaMV 35Sプロモーター

Tnos ノバリン合成酵素遺伝子のターミネーター

virB *Agrobacterium tumefaciens* A281に含まれるTiプラスミドpTiBo542のヴィルレンス領域中のvirB遺伝子

virC *Agrobacterium tumefaciens* A281に含まれるTiプラスミドpTiBo542のヴィルレンス領域中のvirC遺伝子

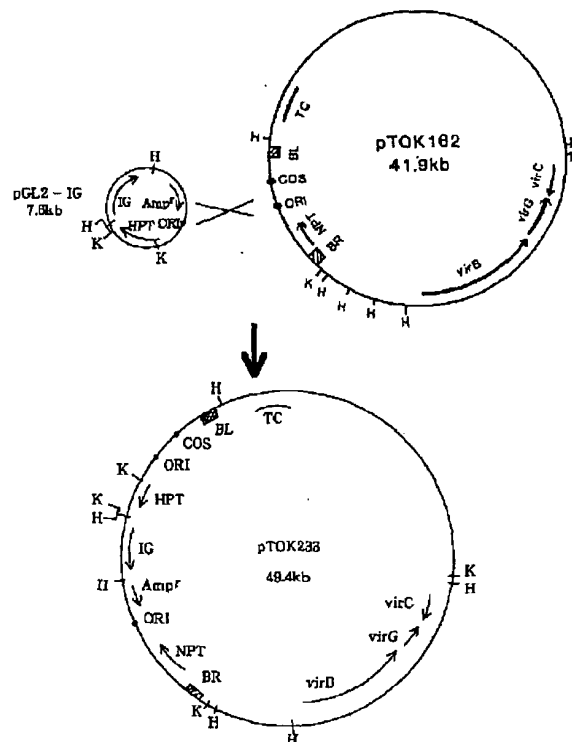
virG *Agrobacterium tumefaciens* A281に含まれるTiプラスミドpTiBo542のヴィルレンス領域中のvirG遺伝子

Vir アグロバクテリウム属細菌のTiプラスミドの全vir領域

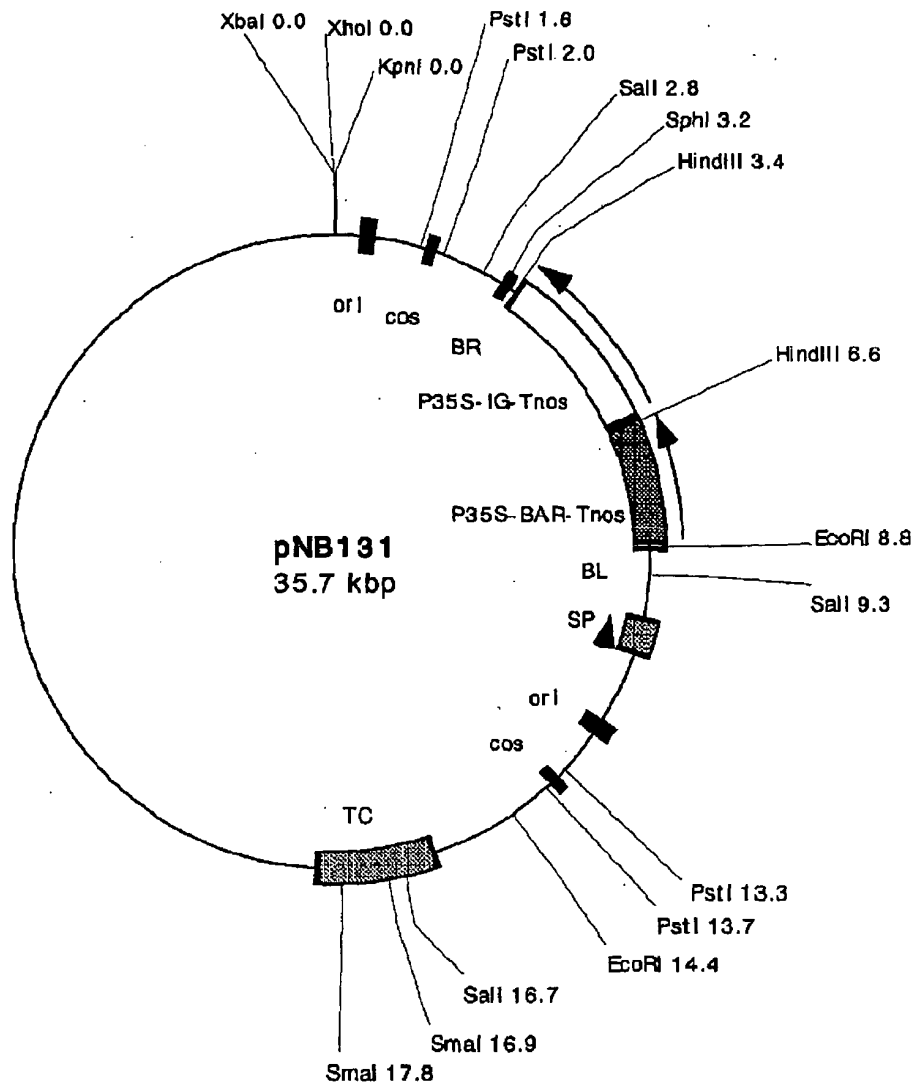
S Vir 強病原性アグロバクテリウム属細菌のTiプラスミドpTiBo542の全vir領域

s vir\* TiプラスミドpTiBo542のvir領域の一部を含む断片

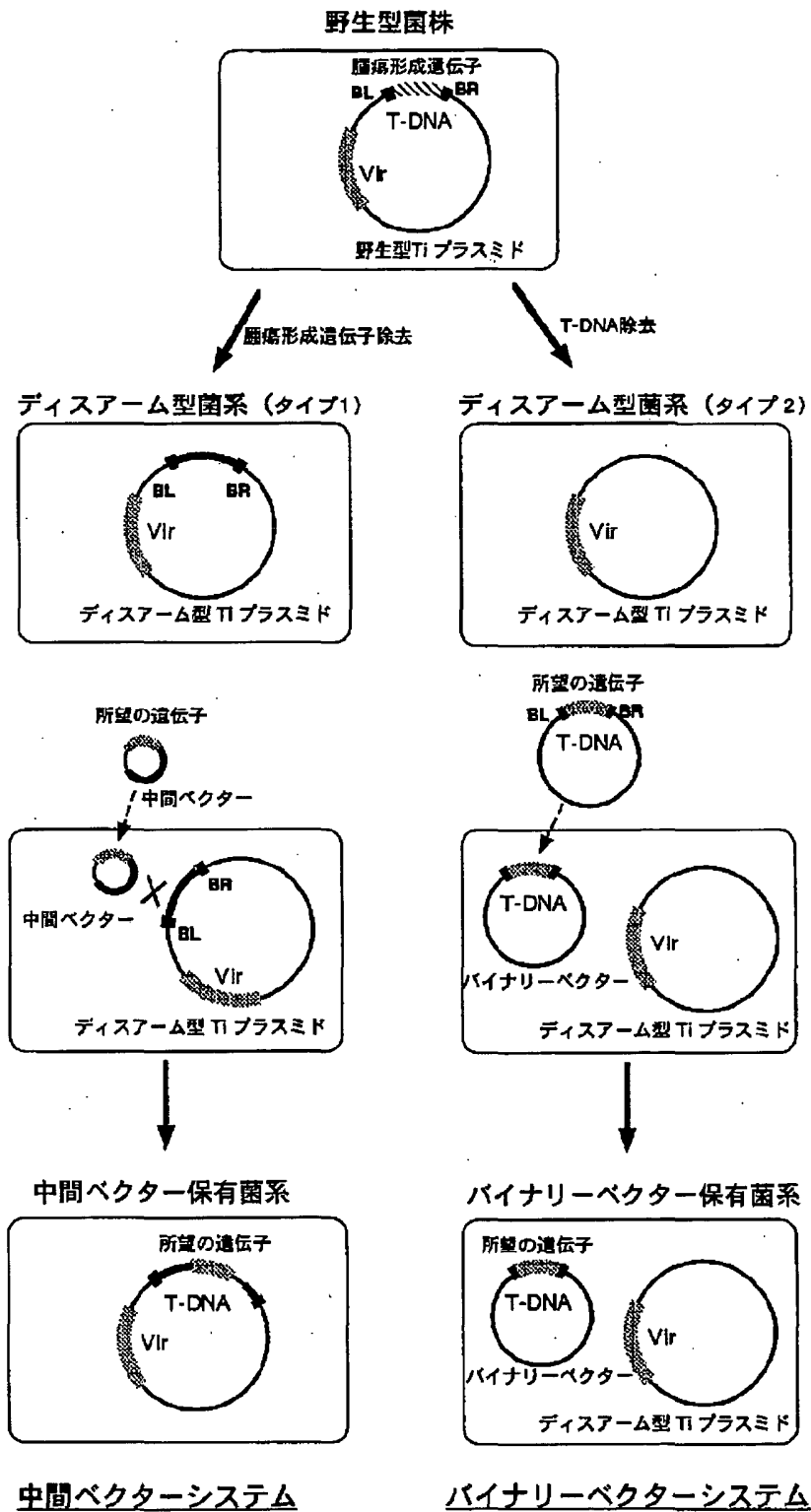
【図1】



【図 2】

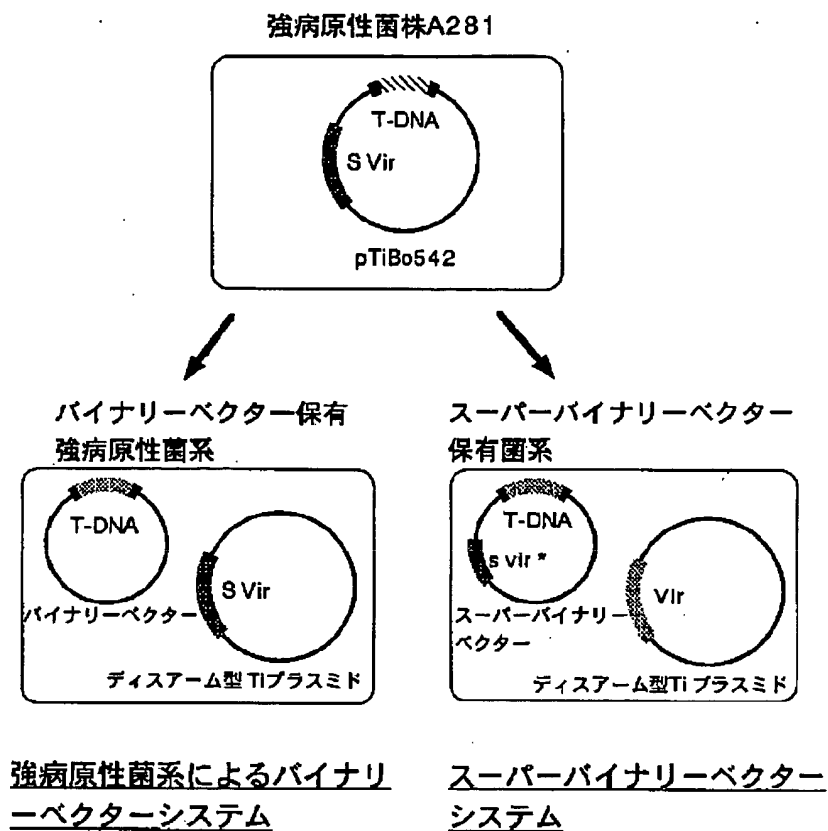


【図3】





【図4】



フロントページの続き

(72)発明者 石田 祐二  
静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本た  
ばこ産業株式会社遺伝育種研究所内

Fターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD20 CA19 CB03  
CD03 CD06 CD09 CD13 CD14  
CD17  
4B024 AA08 DA01 GA11 HA20